

## PREGLEDNI RAD

## Postupak biokonzerviranja u proizvodnji fermentiranih kobasica

**Gamble, H.R. (1998):** Sensitivity of artificial digestion and enzyme immunoassay methods of inspection for trichinae in pigs. *Journal of Food Protection* 61, 339-343.

**Kapel, C.M.O., H.R. Gamble (2000):** Infectivity, persistence and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *International Journal of Parasitology* 30, 215-221.

**Monroy, H., M. Flores-Trujillo, E. Benitez, C. Arriaga (2001):** Swine trichinellosis in slaughterhouses of the metropolitan area of Toluca. *Parasite* 8, 249-251.

**Nagano, I., Z. Wu, A. Matsuo, E. Pozio, Y. Takahashi (1999):** Identification of *Trichinella* genotypes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *International Journal of Parasitology* 29, 1113-1120.

**Noeckler, K., E. Pozio, W.P. Voigt, J. Heidrich (2000):** Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Veterinary parasitology* 93, 335-350.

**Owen, R. (1835):** Description of a microscopical infestation of the muscles of the human body. *Trans. Zool. Soc. London*, 1:315-323.

**Pozio, E., G. La Rosa, P. Rossi, R. Fico (1989):** Survival of *Trichinella* muscle larvae in frozen wolf tissue in Italy. *Journal of Parasitology* 75, 472-473.

**Pozio, E., G. La Rosa, K.D. Murrell, J.R. Lichtenfels (1992):** Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal of Parasitology* 78, 654-659.

**Pozio, E., G. La Rosa, W. Mignone, M. Amati, C. Ercolini (1992a):** Survival of muscle larvae of *Trichinella* britovi in frozen muscle tissues of wild boar. *Arch. Vet. Ital.* 43, 57-60.

**Pozio, E. (1998):** *Trichinellosis in the European union: epidemiology, ecology and economic impact.* *Parasitology today* 14, 35-38.

**Pozio, E., G. La Rosa (2000):** *Trichinella murrelli* n. spp.: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *Journal of Parasitology* 86, 134-139.

**Ritterson, A.L. (1959):** Innate resistance of species of hamster to *Trichinella spiralis* and its reversal by cortisone. *Journal Infect. Dis.* 105, 253-266.

**Ruitenberg, E.J., A. Steerenberg, B.J. Brosi, J. Buys (1974):** Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. *Bull. W.H.O.* 51, 108-109.

**Sukhedo, M.V.K., E. Meerovitch (1977):** Comparison of three geographical isolates of *Trichinella*. *Canadian Journal of Zoology* 55, 2060-2064.

**Theodoropoulos, G., C.M.O. Kapel, P. Webster, L. Saravanos, J. Zaki, K. Koutsotolis (2000):** Infectivity, predilection sites and freeze tolerance of *Trichinella* spp. in experimentally infected sheep. *Parasitology Research* 86, 401-405.

**Van Knapen, F. (2000):** Control of trichinellosis by inspection and farm management practices. *Veterinary Parasitology* 93 (3-4): 385-392.

**Wee, S.H., C.G. Lee, H.G. Joo, Y.B. Kang (2001):** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Trichinella spiralis* antibodies and the surveillance of selected pig breeding farms in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 39, 261-264.

Prispjelo/Received 4.1.2007.

Prihvaćeno/Accepted 18.1.2007. ■

# POSTUPAK BIOKONZERVIRANJA U PROIZVODNJI FERMENTIRANIH KOBASICA

Zdolec<sup>1</sup>, N., M. Hadžiosmanović<sup>1</sup>, L. Kozačinski<sup>1</sup>, Ž. Cvrtila<sup>1</sup>, I. Filipović<sup>1</sup>

## SAŽETAK

Proizvodnja zdravstveno ispravnih i kvalitetnih animalnih namirnica osniva se na primjeni suvremenih higijensko-tehnoloških postupaka. U okviru tzv. zaštitnog koncepta primjenjuju se zaštitne kulture mikroorganizama tj. antagonističke kulture koje inhibiraju patogene mikroorganizme i/ili produžuju održivost hrane uz istovremeno očuvanje

senzornih svojstava proizvoda. Uz inhibicijsko djelovanje organskih kiselina na patogene mikroorganizme, posebice gram-negativne bakterije, drugi vid antagonizma očituje se u sintetiziranju antimikrobnih peptida ili proteina – bakteriocina. Primjena sojeva koji sintetiziraju bakteriocine (bakteriocinogeni sojevi) kao zaštitnih kultura te izravna primjena spomenutih tzv. prirodnih zaštitnih tvari

<sup>1</sup> Nevijo Zdolec, dr.vet.med., znanstveni novak - asistent, dr.sc. Mirza Hadžiosmanović, redoviti profesor; dr. sc. Lidija Kozačinski, izvanredni profesor, dr. sc. Željka Cvrtila, viši asistent; Ivana Filipović, dr. vet. med, znanstveni novak – asistent; Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, Zagreb; kontakt e-mail: nzdolec@vef.hr

(biokonzervansi) u proizvodnji fermentiranih kobasica dio su zaštitnog koncepta u prehrambenoj industriji.

**Ključne riječi:** biokonzerviranje, fermentirane kobasice

## UVOD

U suvremenoj prehrambenoj industriji uvode se različite zaštitne tehnologije kao čimbenici unaprjeđenja sigurnosti i kakvoće namirnica, a time i bolje zaštite zdravlja i ekonomskih interesa potrošača. Tradicionalni način proizvodnje fermentiranih kobasica očuvan je i danas, no prirodna proizvodnja ne pruža standardnu kakvoću i nije količinski dostatna za potrebe tržišta za tom vrstom mesnih proizvoda. S tim u vezi, prirodna proizvodnja se razvojem tehnoloških procesnih postupaka pretočila u industrijske okvire čime je osigurana kontinuirana proizvodnja kobasica ujednačene kakvoće, ali i uspostavljen sustav pouzdane veterinarsko-sanitarne kontrole i nadzora u proizvodnji i prometu.

Podaci o fermentaciji kao postupku konzerviranja hrane mogu se pronaći u drevnim zapisima starima nekoliko tisuća godina, dok je uloga mikroorganizama u procesu fermentacije poznata od vremena Louisa Pasteura (Caplice i Fitzgerald, 1999; Ross i sur., 2002). Iako je uloga i značenje mikroorganizama u procesu zrenja fermentiranih namirnica, a time i fermentiranih kobasica, bila predmetom brojnih znanstvenih polemika, vremenom je usvojeno mišljenje da su biokemijske, fizikalne, organoleptičke i druge promjene u hrani, ne zanemarujući i druge čimbenike (mikroklimat, tkivni enzimi i dr.), uvjetovane aktivnošću prisutne mikroflore (Hadžiosmanović, 1978). Na osnovi saznanja o spomenutoj biokemijskoj aktivnosti mikroorganizama, u proizvodnju fermentiranih kobasica je uveden postupak primjene mikrobnih starter kultura čime je načinjen veliki korak prema ubrzanju proizvodnog procesa, unaprjeđenju kakvoće, odnosno ujednačavanju senzornih svojstava gotovih proizvoda. Pored navedenog, zaštitna komponenta pojedinih starter mikroorganizama, poglavito bakterija mliječne kiseline, bitna je u kontekstu sigurnosti fermentiranih kobasica, a pojedinim vrstama pripisuju se i probiotska svojstva (Työppönen, 2003a). Zaštitno djelovanje bakterija mliječne kiseline u nadjevu fermentiranih kobasica očituje se antagonističkim djelovanjem prema mikroorganizmima kvarenja i patogenim

mikroorganizmima preko antimikrobnih produkata poput organskih kiselina ili bakteriocina (Leistner i Gorris, 1995; Lücke, 2000; Leroy i sur., 2006; Ammor i Mayo, 2007).

Istraživanja primjene bakterija mliječne kiseline koje sintetiziraju bakteriocine (bakteriocinogene kulture) u proizvodnji fermentiranih namirnica kulminirala su posljednjih desetak godina. U prirodnim uvjetima zrenje fermentiranih kobasica odvija se uz pomoć autohtone mikroflore koja djelomično može sadržavati i bakteriocinogene sojeve. Izdvajanjem tih kultura i njihovom primjenom u industrijskom procesu proizvodnje zaključeno je da mogu unaprijediti sigurnost proizvoda.

## MIKROFLORA I ZRENJE

Drevne metode konzerviranja mesa (soljenje, fermentacija, dimljenje, sušenje, uporaba niskih i visokih temperatura i dr.) očuvale su se i danas u suvremenoj industrijskoj proizvodnji mesnih proizvoda. Unaprjeđenjem industrijskih procesnih postupaka razvile su se dodatni zaštitni postupci kojima je svrha u osnovi jednaka kao i u počecima konzerviranja hrane – sprječavanje kvarenja, inhibicija rasta nepoželjne mikroflore i produženje održivosti proizvoda. Pored spomenutih standardnih postupaka u novije vrijeme primjenjuju se različite kemijske tvari u obliku aditiva, zatim zaštitne mikrobne kulture, različiti fizikalni postupci (zračenja, termodinamički procesi, pulsirajuća električna polja) i pakiranja u modificiranoj atmosferi (Devlieghere i sur., 2004.).

Fermentacija je jedan od najstarijih procesa konzerviranja mesa, proces ovisan o biološkoj aktivnosti fermentacijskih mikroorganizama tj. proizvodnji različitih produkata koji mogu potisnuti rast nepoželjne mikrobne flore u namirnicama (Ross i sur., 2002; Hutkins, 2006). Saznanja o ulozi mikroorganizama u procesu fermentacije hrane poznata su od davnina, pa se uvidjela i mogućnost primjene selektiranih sojeva u proizvodnji fermentiranih namirnica u obliku starter kultura. U pogledu fermentiranih kobasica, starter kulture čine bakterije mliječne kiseline i to najčešće predstavnici roda *Lactobacillus* i *Pediococcus*, zatim gram-pozitivni, koagulaza negativni koki – *Staphylococcus* spp. i *Micrococcus* spp., te kvasci i plijesni (Hutkins, 2006). Svaka od

navedenih skupina mikroorganizama posjeduje specifične metaboličke profile te igraju bitnu ulogu i s higijenskog (potiskivanje drugih mikroorganizama – patogenih i mikroorganizama kvarenja) i tehnološkog gledišta (utjecaj na senzorna svojstva).

U tijeku zrenja fermentiranih kobasica odvijaju se složeni mikrobiološki, biokemijski i fizikalno-kemijski procesi koji utječu na sigurnost i kakvoću gotovih proizvoda (Hadžiosmanović i sur., 2005). Stupanj inicijalne mikrobne kontaminacije ovisi o mikrobiološkoj kakvoći upotrijebljene sirovine i dodataka te o (ne)higijenskom pristupu tijekom proizvodnje. No, slijedom temeljnih fizikalno-kemijskih procesa u pojedinim fazama zrenja (snižavanje pH i aktivnosti vode, povećanje količine soli) nastaju endogeni uvjeti koji doprinose razvoju specifične mikroflore (acidofili, halofili, osmofili) ili pak djeluju inhibirajuće na druge mikroorganizme. Odavno je poznato da su najaktivniji mikroorganizmi u nadjevu fermentiranih kobasica bakterije mliječne kiseline te bakterije iz porodice *Micrococcaceae* (Hadžiosmanović, 1978; Buckenhüskes, 1993; Hammes i Hertel, 1997; Lücke, 2000). Osim navedenih, pojedine vrste fermentiranih kobasica karakterizira i stabilna populacija kvasaca, plijesni te enterokoka (Samelis i sur. 1998, Baldini i sur., 2000). Svi oni utječu, zasebno i združeno s tkivnim enzimima, na način i stupanj mijenjanja senzorskih svojstava proizvoda. Primjerice, bakterije mliječne kiseline sudjeluju u acidifikaciji nadjeva razgradnjom ugljikohidrata te posljedično i koagulaciji bjelancevina i procesu sušenja (Työppönen i sur., 2003b). Za porodicu *Micrococcaceae* značajnija je pak lipolitička i proteolitička aktivnost, te utjecaj na promjene boje mišićnog pigmenta procesom denitrifikacije. Princip metaboličke aktivnosti navedenih dviju skupina mikroorganizama ustaljen je i možemo reći prepoznatljiv u svakom mesnom supstratu, međutim raznolikosti u načinu proizvodnje fermentiranih kobasica, sirovini i dodatnim sastojcima, podneblju itd. uvelike utječe na stupanj «afirmacije» pojedinih mikrobnih vrsta ili sojeva, a posljedično i na pokazatelje kakvoće i sigurnosti proizvoda.

Različite regije svijeta prepoznatljive su

po tipičnim fermentiranim kobasicama koje, pored tehnoloških specifičnosti i prepoznatljivih organoleptičkih svojstava, karakterizira i dominacija određenih vrsta mikroorganizama u nadjevu. Istraživanja prirodne, autohtone mikroflore kobasica usmjerena su na praćenje promjena u populaciji pojedinih skupina mikroorganizama tijekom različitih faza zrenja, te na determinaciju vrsta i sojeva koja se danas bazira na suvremenim molekulskim metodama (Urso i sur., 2006a; Cocolin i sur., 2006; Cvrtila, 2006; Hadžiosmanović i sur., 2006). Karakterizacijom bakterija mliječne kiseline u većini istraživanja različitih europskih fermentiranih kobasica utvrđena je dominacija roda *Lactobacillus* i to vrsta *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* i *Lb. plantarum* (Gasparik-Reichardt i sur., 2005, Schillinger i Lücke, 1987). Uz tehnološki poželjne homofermentativne vrste laktobacila, iz nadjeva se učestalo izoliraju i heterofermentativne bakterije mliječne kiseline (*Leuconostoc* spp., heterofermentativni laktobacili). Veće koncentracije CO<sub>2</sub> kao produkta biokemijske aktivnosti te mikroflore u nekim su fermentiranim proizvodima poželjne (mliječni proizvodi), no to nikako nije slučaj s fermentiranim kobasicama. Uklanjanje tog nedostatka moguće je primjenom dobro prilagođenih i tehnološki prihvatljivih sojeva laktobacila u vidu starter-kultura (Kožačinski i sur., 2006). Među pripadnicima porodice *Micrococcaceae*, u nadjevu fermentiranih kobasica najučestalije su izolirani *S. xylosus*, *S. saprophyticus* i *S. carnosus* (Garcia-Varona, 2000; Papamanoli i sur., 2002, Mauriello i sur., 2004; Drosinos i sur., 2005; Iacumin i sur., 2006; Martin i sur., 2006; Martin i sur., 2007). Na osnovi spoznaja o biokemijskoj aktivnosti mikroorganizama i njihova utjecaja na ukupnu kakvoću fermentiranih kobasica, pojedine selektirane bakterijske vrste počele su se uvoditi u nadjev u vidu starter kultura što je unaprijedilo tradicionalne postupke proizvodnje (Hugas i Monfort, 1997).

Svrha dodavanja mikrobnih starter kultura u nadjev fermentiranih kobasica jest potiskivanje bakterija kvarenja (heterofermentativni laktobacili, klostridije, *Leuconostoc* spp.) i eventualno prisutnih patogenih mikroorganizama što se postiže intenzivnijom acidifikacijom te sintezom antimikrobnih produkata poput bakteriocina (Zdolec i sur., 2005a). Rezultati i zaključci brojnih istraživanja afirmativni su prema

primjeni bakteriocinogenih bakterija mliječne kiseline u proizvodnji fermentiranih kobasica. To se poglavito odnosi na istraživanja utjecaja tzv. zaštitnih kultura na umjetno inokulirane populacije patogenih bakterija poput *Listeria monocytogenes* ili *Escherichia coli* O157:H7 (Foegeding i sur., 1992; De Martinis i Franco, 1998; Nissen i Holck, 1998; Lahti i sur., 2001; Liserre i sur., 2002; Hugas i sur., 2002; Benkerroum i sur., 2003; Työppönen i sur., 2003a; Benkerroum i sur., 2005; Čaklović i sur., 2005; Zdolec i sur., 2005b; Drosinos i sur., 2006). Nadalje, u higijenskom i tehnološkom smislu značajni su i rezultati istraživanja utjecaja bakteriocinogenih bakterija mliječne kiseline na prirodnu, autohtonu mikrofloru fermentiranih kobasica i fizikalno-kemijske procese koji se odvijaju u tijeku zrenjabutina, rebara i plečki.

## BIOKONZERVIRANJE

Brojna istraživanja autohtone mikroflore fermentiranih kobasica provedena posljednjih godina pokazala su da su najučestalije izolirane vrste bakterija mliječne kiseline u fermentiranim kobasicama *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* (Drosinos i sur., 2005; Comi i sur., 2005; Kozačinski i sur., 2006). Pojedini sojevi navedenih, ali i drugih vrsta bakterija mliječne kiseline, posjeduju sposobnost sinteze bakteriocina, antimikrobnih peptida ili proteina aktivnih u inhibiranju rasta drugih bakterija. Selekcija bakteriocinogenih sojeva posljednjih godina uzela je maha u cilju otkrivanja najjačih antagonista i tehnološki prihvatljivih vrsta radi primjene u proizvodnji sigurnijih fermentiranih i drugih mesnih proizvoda (Hadžiosmanović i sur., 2005; Jay i sur., 2005).

Leistner i Gorris (1995) uvode termin «hurdle technology» što podrazumijeva kumulativno djelovanje postojećih (temperatura, aktivnost vode, pH, Eh, konzervansi i dr.) s novijim tehnikama konzerviranja (pakiranje u plinu, tretiranje visokim tlakom, biokonzerviranje) s ciljem uspostavljanja selektivnih zaštitnih čimbenika u kojima patogeni mikroorganizmi i mikroorganizmi kvarenja ne mogu opstati. Povezanost procesa fermentacije i konzerviranja obuhvaćena je pojmom biokonzerviranja (engl. bio-preservation, bioconservation) kao metode produženja održivosti i povećanja sigurnosti hrane uporabom

mikroorganizama i/ili njihovih produkata (Ross i sur., 2002). Sličnu definiciju biokonzerviranja daje Stiles (1996) koji navodi da se ono odnosi na produženje vremena pohrane i povećanje sigurnosti hrane primjenom njene prirodne ili kontrolirane mikroflora i/ili antibakterijskih produkata. U okviru tzv. zaštitnog koncepta primjenjuju se zaštitne kulture mikroorganizama (engl. protective cultures) tj. antagonističke kulture koje inhibiraju patogene mikroorganizme i/ili produžuju održivost hrane uz istovremeno očuvanje senzornih svojstva proizvoda. Njihov antagonizam očituje se inhibicijom drugih mikroorganizama putem nadmetanja za hranjivim tvarima i/ili proizvodnjom jednog ili više antimikrobnih metabolita poput organskih kiselina (mliječna, octena), vodikovog peroksida, antimikrobnih enzima, bakteriocina i reuterina (Holzapfel i sur., 1995; cit. Devlieghere i sur., 2004; Montville i Matthews, 2005). U pogledu mesa i mesnih proizvoda, biokonzerviranje se može primijeniti na 4 načina (Hugas, 1998):

a) dodavanje čiste bakteriocinogene kulture bakterija mliječne kiseline čime se bakteriocin uvodi neizravno u namirnicu, a učinkovitost metode ovisi o sposobnosti rasta kulture i sinteze bakteriocina u izvjesnoj namirnici i danim uvjetima;

b) dodavanje nepročišćene otopine bakteriocina, fermentacijske kulture ili koncentrata iz bakteriocinogene kulture;

c) dodavanje pročišćenog ili polupročišćenog bakteriocina čime je omogućeno njegovo točnije doziranje. Primjena je ograničena zakonskom regulativom o prehranbenim aditivima;

d) dodavanje mezofilnih bakterija mliječne kiseline kao zaštite pri temperaturnim oscilacijama pri pohrani namirnica. Pri oscilaciji soj će rasti i kompeticijski djelovati prema patogenoj mikroflori.

Kako navodi Lücke (2000) zaštitne kulture mogu se implementirati i u nefermentirane mesne proizvode (pr. Bologna – tip kobasice; naresci) i to:

a) u obliku bakteriocinogenih mezofilnih bakterija mliječne kiseline aktivnih prema *L. monocytogenes* i drugim gram-pozitivnim bakterijama

b) kao psihotrofne bakterije mliječne kiseline koje kod uskladištenja u hladnom stvaraju dovoljno mliječne kiseline da spriječe rast drugih psihotrofa i pritom ne uzrokuju senzorne promjene

c) kao mezofilne bakterije mliječne kiseline koje



postaju aktivne brzo nakon temperaturnih kolebanja hlađenog proizvoda.

Isti autor naglašava da je glavni mehanizam djelovanja zaštitnih kultura na kompeticijsku mikrofloru putem stvaranja mliječne kiseline, dok je učinak bakteriocina smanjen njihovom inaktivacijom u mesu i pojavom rezistencije. Također, upotreba bakteriocinogenih bakterija mliječne kiseline ne može dati rezultata u prevenciji crijevnih infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama (pr. EHEC) kao ni u produženju održivosti aerobno skladištenog mesa. Vermeiren i sur. (2004) također ističu opravdanost primjene bakterija mliječne kiseline kao zaštitnih kultura u proizvodnji kuhanih mesnih proizvoda.

Prilikom izbora tj. selekcije bakteriocinogenih bakterija mliječne kiseline u svrhu primjene u određenoj namirnici, u obzir se treba uzeti više čimbenika: GRAS status (engl. Generally Recognized As Safe), širina spektra inhibicije mikroorganizama, odnos bakteriocina prema toplini, rizik za zdravlje ljudi, stupanj unaprjeđenja sigurnosti i kakvoće, visokospecifična aktivnost (Holzapfel i sur., 1995.; cit. O' Sullivan i sur., 2002). Suvremena istraživanja u molekularnoj biologiji idu u smjeru razvoja zaštitnih kultura nove generacije. Buduća istraživanja bakteriocinogenih kultura u tom smislu trebaju se odvijati u 3 faze i to:

a) bolja i ciljana selekcija uporabom screening metoda

b) genetska optimizaciji rekombinantnom DNA tehnologijom

c) proširenje spektra aktivnosti u kombinaciji s aditivima iz hrane ili prirodnim sastojcima ili pak tehnologijama poput visokog tlaka i pulsirajućeg električnog polja (Devlieghere i sur., 2004).

Autori navode da u postupku biokonzerviranja značenje treba pridavati također i bakterijama mliječne kiseline čiji se antagonizam osniva na proizvodnji mliječne kiseline i acidifikaciji, proizvodnji drugih antimikrobnih tvari te kompeticiji za hranjivim tvarima u supstratu, a ne sintezi bakteriocina.

## ZAKLJUČAK

Zdravstvena ispravnost hrane prioritetna je u zaštiti zdravlja potrošača kojom se jamči njihova sigurnost i štite ekonomski interesi. U pogledu sigurnosti hrane, mikrobiološka ispravnost čini njen važan dio, na

koji se može utjecati brojnim procesnim postupcima. Dobro je poznato da za rast i razmnožavanje mikroorganizama (bilo koje vrste) moraju postojati optimalni uvjeti. U proizvodnji mesnih proizvoda u tom se smislu upravljanjem proizvodnim tehnologijama izravno utječe i na poticanje rasta ciljanih mikrobnih vrsta, dok se druge istim metodama ili u kombinaciji s drugima sistiraju ili uništavaju. Postupak biokonzerviranja tj. primjene neškodljivih kultura mikroorganizama i njihovih antimikrobnih metabolita dodatni je zaštitni faktor u proizvodnji sigurnije hrane. Samo po sebi biokonzerviranje nije jamstvo mikrobiološke ispravnosti namirnice, a da bi imalo smisla i učinka, ono mora biti nadgradnja na dobru proizvođačku i dobru higijensku praksu.

## SUMMARY

### **BIOCONSERVATION IN THE PRODUCTION OF DRY FERMENTED SAUSAGES**

*Production of foods of animal origin of adequate safety and quality is based on the use of modern hygienic and technological procedures. Within the framework of the so-called protective concept, protective cultures are used, i.e. antagonistic cultures, which inhibit pathogenic microorganisms and/or prolong shelf life and at the same time maintaining the sensory properties of a food product. In addition to inhibitory action of organic acids on pathogenic microorganisms, in particular gram-negative bacteria, another aspect of antagonism is manifested in the production of antimicrobial peptides or proteins – bacteriocins. The use of bacteriocin-synthesising strains (bacteriocinogenic strains) as protective cultures and direct use of the indicated, so-called natural protective substances (bio-preservatives) in the production of fermented sausages are components of the protective concept in food industry.*

**Key words:** bioconservation, fermented sausages

\* Autori se zahvaljuju Ministarstvu znanosti, obrazovanja i športa koje podupire znanstvene projekte «Veterinarsko javno zdravstvo u proizvodnji zdrave hrane» (053-05318-54-1851) i «Mikrobiološka kakvoća i održivost namirnica životinjskog podrijetla» (053-0531854-1853).

## LITERATURA

- Ammor, M. S., B. Mayo (2007): Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci.* 76, 138-146.
- Baldini, P., E. Cantoni, F. Colla, C. Diaferia, L. Gabba, E. Spotti, R. Marchelli, A. Dossena, E. Virgili, S. Sforza, P. Tenca, A. Mangia, R. Jordano, M. C. Lopez, L. Medina, S. Cou-

- durier, S. Oddou, G. Solignat (2000):** Dry sausage ripening: Influence of thermo-hygrometric conditions on microbiological, chemical and physico-chemical characteristics. *Food Res. Int.* 33, 161-170.
- Benkerroum, N., A. Daoudi, M. Kamal (2003):** Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw sausages (merguez) in presence of a bacteriocin-producing lactococcal strain as a protective culture. *Meat Sci.* 63, 479-484.
- Benkerroum, N., A. Daoudi, T. Hamraoui, H. Ghalfi, C. Thiry, M. Duroy, P. Evrart, D. Roblain, P. Thonart (2005):** Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 98, 56-63.
- Buckenhüskes, H. J. (1993):** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 253-272.
- Caplice E., G. F. Fitzgerald (1999):** Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 131-149.
- Cocolin, L., R. Urso, K. Rantsiou, C. Cantoni, G. Comi (2006):** Multiphasic approach to study the bacterial ecology of fermented sausages inoculated with a commercial starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 942-945.
- Comi, G., R. Urso, L. Iacumin, K. Rantsiou, P. Cattaneo, C. Cantoni, L. Cocolin (2005):** Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci.* 69, 381-392.
- Cvrtila, Ž. (2006):** Identifikacija laktobacila u tijeku zrenja trajnih kobasica pomoću lančane reakcije polimerazom. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet Zagreb.
- Čaklović, F., D. Alagić, M. Smajlović, L. Kozačinski, Ž. Cvrtila, S. Vesković-Moračanin, J. Gasparik-Reichardt, N. Zdolec (2006):** Utjecaj bakterija mliječne kiseline na *L. monocytogenes* tijekom proizvodnje tradicionalno fermentiranih kobasica. *Meso VIII*, 3, 140-143.
- De Martinis, E. C. P., B. D. G. M. Franco (1998):** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 119-126.
- Devlieghere, F., L. Vermeiren, J. Debevere (2004):** New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14, 273-285.
- Drosinos, E. H., M. Mataragas, N. Xirapi, G. Moschonas, F. Gaitis, J. Metaxopoulos (2005):** Characterisation of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Sci.* 69, 307-317.
- Drosinos, E. H., M. Mataragas, S. Vesković-Moračanin, J. Gasparik-Reichardt, M. Hadžiosmanović, D. Alagić (2006):** Quantifying nonthermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in European fermented sausages using bacteriocinogenic lactic acid bacteria or their bacteriocins: A case study for risk assessment. *J. Food Prot.* 69, 2648-2663.
- Foegeding, P. M., A. B. Thomas, D. H. Pilkington, T. R. Klaenhammer (1992):** Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 884-890.
- Garcia-Varona, M., E. M. Santos, I. Jaime, J. Rovira (2000):** Characterisation of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 189-195.
- Gasparik-Reichardt, J., Sz. Toth, L. Cocolin, G. Comi, E. H. Drosinos, Ž. Cvrtila, L. Kozačinski, A. Smajlović, S. Saičić, B. Borović (2005):** Technological, physicochemical and microbiological characteristics of traditionally fermented sausages in Mediterranean and Central European countries. *Tehnologija mesa* 46(3-4), 143-153.
- Hadžiosmanović, M. (1978):** Utjecaj mikrokoka na lipolitičke promjene u nadjevu trajnih kobasica. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet Zagreb.
- Hadžiosmanović, M., J. Gasparik-Reichardt, M. Smajlović, S. Vesković-Moračanin, N. Zdolec (2005):** Possible use of bacteriocins and starter cultures in upgrading of quality and safety of traditionally fermented sausages. *Tehnologija mesa* 46, 194-211.
- Hadžiosmanović, M., L. Kozačinski, Ž. Cvrtila, N. Zdolec, I. Filipović (2006):** Safety of traditional fermented sausages: research on protective cultures and bacteriocins. *Završno izvješće*, Zagreb, 2006.
- Hammes, W. P., C. Hertel (1998):** New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49, Suppl. 1, 125-138.
- Holzappel, W. H., R. Geisen, U. Schillinger (1995):** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 343-362.
- Hugas, M., J. M. Monfort (1997):** Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chem.* 59, 547-554.
- Hugas, M. (1998):** Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of meat and Meat Products. *Meat Sci.* 49 (Suppl 1), 139-150.
- Hugas, M., M. Garriga, M. Pascual, M. T. Aymerich, J. M. Monfort (2002):** Enhancement of sakacin K Activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. *Food Microbiol.* 19, 519-528.
- Hutkins, R. W. (2006):** Meat fermentation. U: *Microbiology and technology of fermented foods*, Blackwell Publishing, 207-232.
- Iacumin, L., G. Comi, C. Cantoni, L. Cocolin (2006):** Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. *Sys. Appl. Microbiol.* 29, 480-486.
- Jay, J. M., M. J. Loessner, D. A. Golden (2005):** Food Protection with Chemicals, and by Biocontrol. U: *Modern Food Microbiology*, Springer, 301-350.
- Kozačinski, L., N. Zdolec, M. Hadžiosmanović, Ž. Cvrtila, I. Filipović, T. Majić (2006):** Microbial flora of the Croatian fermented sausage. *Arch. Lebensmittelhyg.* 57, 141-147.
- Lahti, E., T. Johansson, T. Honkanen-Buzalski, P. Hill, E. Nurmi (2001):** Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiol.* 18, 75-85.
- Leistner, L., L. G. M. Gorris (1995):** Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Tech.* 6, 41-46.
- Leroy, F., J. Verluyten, L. De Vuyst (2006):** Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 270-285.
- Liserre, A. M., M. Landgraf, M. T. Destro, B. D. G. M. Franco (2002):** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. *Meat Sci.* 61, 449-455.
- Lücke, F.-K. (2000):** Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.*, 105-115.
- Martin, B., M. Garriga, M. Hugas, S. Bover-Cid, M. T. Veciana-Nogues, T. Aymerich (2006):** Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive coc-

ci from slightly fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 107; 148-158.

**Martin, A., B. Colin, E. Aranda, M. J. Benito, M. G. Cordoba (2007):** Characterization of Micrococcaceae isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Sci.* 75, 696-708.

**Mauriello, G., A. Casaburi, G. Blaiotta, F. Villani (2004):** Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci.* 67, 149-158.

**Montville, T. J., K. R. Matthews (2005):** Biologically Based Preservation and Probiotic Bacteria. U: *Food Microbiology – an introduction*, ASM Press, Washington, 311-320.

**Nissen, H., A. Holck (1998):** Survival of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiol.* 15, 273-279.

**O'Sullivan, L., R. P. Ross, C. Hill (2002):** Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593-604.

**Papamanoli, E., P. Kotzekidou, N. Tzanetakis, E. Litopoulou-Tzanetaki (2002):** Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiol.* 19, 441-449.

**Ross, R. P., S. Morgan, C. Hill (2002):** Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3-16.

**Samelis, J., J. Metaxopoulos, M. Vlasi, A. Pappa (1998):** Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 69-82.

**Schillinger, U. F.-K. Lücke (1987):** Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* 4, 199-208.

**Stiles, M. E. (1996):** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Anton Leeuw. Int. J. G.* 70, 331-345.

**Työppönen S., E. Petäjä, T. Mattila-Sandholm (2003a):** Bio-protectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 233-244.

**Työppönen (nee Erkkilä), S., A. Markkula, E. Petäjä, M.-L. Suihko, T. Mattila-Sandholm (2003b):** Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control* 14, 181-185.

**Urso, R., G. Comi, L. Cocolin (2006a):** Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 671-680.

**Vermeiren, L., F. Devlieghere, J. Debevere (2004):** Evaluation of meat lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 149-164.

**Zdolec, N., M. Hadžiosmanović, L. Kozačinski, I. Filipović (2005a):** Utjecaj bakteriocina na mikrobiološku kakvoću fermentiranih kobasica. *Meso VII*, 3; 43-47, 2005.

**Zdolec, N., M. Hadžiosmanović, L. Kozačinski, Ž. Cvrtila, I. Filipović (2006):** Influence of *Lactobacillus sakei* on *Listeria monocytogenes* growth during the ripening of Croatian traditionally fermented sausage. 3rd Central European Congress on Food (CEFOOD), Sofija, Bugarska, 24-26.05.2006. CD Proceedings.

Prispjelo/Received 5.1.2007.

Prihvaćeno/Accepted 26.2.2007.. ■

# OMAMLJIVANJE RIBA

Filipović<sup>1</sup>, I., K. Bojanić<sup>2</sup>, L. Kozačinski<sup>1</sup>, M. Hadžiosmanović<sup>1</sup>, Z. Cvrtila<sup>1</sup>, N. Zdolec<sup>1</sup>

## SAŽETAK

*U radu je opisan utjecaj različitih metoda omamljivanja i usmrćivanja riba na kakvoću njihovog mesa. Pojedine, manje humane metode omamljivanja indiciraju sekundarni stresni odgovor u riba, koji za posljedicu ima bržu razgradnju ATP-a u mišićju, brži pad pH, te brži nastup i otpuštanje mrtvačke ukočenosti. Nadalje, stres nastao prilikom omamljivanja i usmrćivanja riba može imati i negativan utjecaj na teksturu mesa, kao i na održivost. Odabir prikladne metode ovisi i o vrsti i veličini ribe.*

**Ključne riječi:** metode omamljivanja, dobrobit riba, kakvoća mesa

## UVOD

Kakvoća, sigurnost i zdravstvena ispravnost hrane primarna su briga i općeprihvaćeni koncept zaštite zdravlja ljudi. Ne manje značajni su i etički aspekti proizvodnje hrane, prije svega zaštita okoliša i dobrobit životinja. U tom su smislu sve glasnjiji zahtjevi za primjenom humanih postupaka pri izlovu riba iz ribogojilišta (Cooke, 2001). Tri su glavna zahtjeva humanog usmrćivanja: smanjivanje uzbuđenja, boli i patnje prilikom postupka usmrćivanja, postizanje neosjetljivosti životinje na bol unutar jedne sekunde

<sup>1</sup> Ivana Filipović, dr. vet. med. znanstvena novakinja - asistentica; dr. sc. Lidija Kozačinski, izvanredna profesorica; dr. sc. Mirza Hadžiosmanović, redoviti profesor; dr. sc. Željka Cvrtila, viši asistent; Nevijo Zdolec, dr. vet. med., znanstveni novak - asistent

<sup>2</sup> Krunoslav Bojanić, dr. vet. med, Zagreb